

**Über die Ausscheidung von
Pregnantriol und Pregnantriolon im Harn
unter ACTH-Stimulation beim kongenitalen
adrenogenitalen Syndroms (AGS).**

Versuch eines Heterozygoten -Tests.

Eva-Maria Fikentscher

1974
—

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. K. Betke

Über die Ausscheidung von Pregnantriol und
Pregnantriolon im Harn unter ACTH-Stimulation
beim kongenitalen adrenogenitalen Syndrom (AGS).

Versuch eines Heterozygoten - Tests.

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin verfaßt und einer Hohen Medizinischen
Fakultät der Ludwig Maximilians - Universität
zu München

vorgelegt von

Eva - Maria Fikentscher

aus

München

Jahr

1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Prof.Dr.med. D. Knorr

Mitberichterstatter: Prof.Dr.med. K. Betke

Dekan: Prof.Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.9.1974



Inhaltsverzeichnis

Seite

A.	Einleitung. Begründung der Suche nach einem aussagekräftigen Heterozygotentest für das kongenitale adrenogenitale Syndrom.	1
B.	Kurzer Überblick über Fortschritte und problematische Teilaspekte im heutigen Verständnis des Krankheitsbildes 'AGS'.	4
C.	Durchführung des Heterozygotentests	
C.I.	Analysengang und Methode zur Bestimmung von Pregnantriol und Pregnantriolon im 24-Std.-Urin.	
	a) Material und Apparaturen.	9
	b) Analysengang und Methode.	10
C.II.	Vorversuche.	15
C.III.	Durchführung eines ACTH-Belastungsversuchs an mutmaßlich genetisch unbelasteten Erwachsenen im generationsfähigen Alter und an Eltern bekannter AGS-Patienten.	19
D.I.	Auswertung und Darstellung der erhaltenen Pregnantriol- und Pregnantriolonwerte.	21
	1) Pregnantriol.	23
	2) Pregnantriolon.	29

./.

D.II.	Signifikanz-Prüfung (t-Test).	37
1)	Pregnantriol	37
2)	Pregnantriolon	38
E.	Diskussion.	40
F.	Zusammenfassung.	46
G.	Literaturverzeichnis.	47

A. Einleitung.

Begründung der Suche nach einem aussagekräftigen Heterozygotentest für das kongenitale adrenogenitale Syndrom.

Unter dem Begriff "Adrenogenitales Syndrom" (AGS) werden im deutschen Schrifttum ätiologisch und pathogenetisch uneinheitliche Krankheitsbilder zusammengefaßt, denen eine Überproduktion adrenaler Androgene gemeinsam ist:

- 1) Das kongenitale adrenogenitale Syndrom, dessen Ursache ein genetisch bedingter Enzymdefekt in der Cortisol-Biosynthese ist, und das im angelsächsischen Schrifttum meist als "kongenitale virilisierende Nebennierenrindenhypertrophie" bezeichnet wird.
- 2) Das 'erworbene' AGS, meist auf Grund eines androgenbildenden NNR-Tumors. So bezeichnet werden aber auch hyperplasiebedingte Spätmanifestationen des AGS, die nach anfänglich unauffälliger somatischer Entwicklung auftreten, und bei denen es sich höchstwahrscheinlich immer um leichte Fälle des kongenitalen AGS handelt (1; 7; 24; 42; 59).

Im folgenden wird der Begriff 'AGS' immer synonym für die kongenitale NNR-Hyperplasie, speziell für den C-21-Hydroxylase-Defekt gebraucht.

Die meisten bisherigen Informationen über die Genetik des AGS wurden wegen der Seltenheit der anderen Enzymdefekte am C-21-Hydroxylase-Defekt gewonnen (BONGIOVANNI et al.(7)). Wie die meisten hereditären Stoffwechselstörungen wird es autosomal rezessiv vererbt (34; 35; 51),

die verschiedenen Unterformen werden unabhängig voneinander vererbt (PRADER (44)), in einer Familie tritt immer nur ein bestimmter Typ des Defekts auf (7; 13; 44; 64).

CHILDS et al.(12) geben 1956 für Maryland/USA eine Häufigkeit des AGS von 1:67 000 Lebendgeborenen und eine Heterozygotenfrequenz von 1:128 an. PRADER (45) gibt für den Kanton Zürich eine Frequenz von 1:5 000 und eine Heterozygotenfrequenz von 1:37 an, und später, daß allgemein mit einer Häufigkeit von 1:5 000 Geburten zu rechnen sei (PRADER (44)).

Angesichts dieser Heterozygotenhäufigkeit in der Bevölkerung erscheint die Suche nach einem zuverlässigen Heterozygotentest in Hinblick auf eine wünschenswerte genetische Beratung homozygoter Patienten und sicher oder mutmaßlich Heterozygoter naheliegend.

Bei einem autosomal-rezessiven Enzymdefekt ist unter Normalbedingungen durch das intakte Allel eine normale Funktion des Enzyms gewährleistet, der Defekt wird nicht manifest (LENZ (34)). Unter Belastungsbedingungen des betreffenden Stoffwechselweges - hier durch eine vermehrte Stimulation der NNR durch exogen zugeführtes ACTH - könnte eine bei heterozygoten Merkmalsträgern eventuell latent vorhandene Schwäche im C-21-Hydroxylierungsprozeß manifest werden.

In diesem Fall wird sich das entsprechende Substrat (17 α -Hydroxyprogesteron) vor der C-21-Hydroxylierung anhäufen, seine Metaboliten Pregnantriol und Pregnantrion werden im Urin vermehrt ausgeschieden.

Bei einem signifikanten Unterschied zum Verhalten

genetisch unbelasteter Probanden unter Belastungsbedingungen wäre die Erkennung heterozygoter Merkmalsträger möglich. Auf diesen Überlegungen basiert der später beschriebene ACTH-Belastungstest.

B. Kurzer Überblick über Fortschritte und problematische
Teilaspekte im heutigen Verständnis des Krankheitsbil-
des 'AGS'.

Die häufigste Form der virilisierenden NNR-Hyperplasie (nach BONGIOVANNI et al.(7) etwa 90%) ist durch einen Hydroxylierungsdefekts am C-21-Atom bedingt. Dabei ist bei einem partiellen Mangel der C-21-Hydroxylase nur die Glucocorticoidsynthese gestört, die Mineralocorticoidsynthese, die schon normalerweise nur etwa 1/100 der Cortisolproduktion beträgt (BLUNCK (4)), noch ausreichend, um die tubuläre Natrium-Rückresorption aufrecht zu erhalten.

Bei einem hochgradigen oder kompletten Enzymdefekt ist auch die Mineralocorticoidsynthese ungenügend, aus der mangelnden Aldosteronbildung resultiert ein vermehrter renaler Natrium- und Wasserverlust, mit der Entwicklung lebensbedrohlicher Salzverlust-Krisen.

Diese These der unterschiedlichen Schweregrade des-
selben Enzymdefektes bei beiden AGS-Formen wird von BONGIOVANNI et al.(5; 6), PRADER (46) vertreten, andere Autoren wie DEGENHARDT, VISSER et al.(15), HAMILTON (26) diskutieren zwei verschiedene genetisch kontrollierte Veränderungen des C-21-Hydroxylierungsprozesses.

Die Frage ist nach wie vor ungeklärt, da die beteiligten Enzyme bisher nicht isoliert wurden (5; 64); ebenso wie die mögliche Existenz eines 'Natrium-diuretischen Faktors', die von mehreren Autoren diskutiert wird, bisher aber nicht eindeutig bewiesen ist (1; 3; 15; 24; 46; 57; 59).

Beim unkomplizierten AGS kommt es durch den mangelhaften Cortisolspiegel im Regelkreis NNR-Hypothalamus-HVL zu

einer vermehrten ACTH-Ausschüttung und dadurch zu einer Überstimulierung und kompensatorischen Hypertrophie der NNR (1; 5; 31; 64), mit einer starken Überproduktion adrenaler Androgene, deren Synthese ja nicht beeinträchtigt ist.

Die daraus resultierende Virilisierung bestimmt neben der ebenfalls androgen bedingten allgemeinen Wachstumsbeschleunigung mit späterem vorzeitigem Epiphysenfugenschluß das klinische Bild bei beiden Geschlechtern. Bei den Mädchen resultiert ein Pseudohermaphroditismus femininus, wobei das Genitale je nach Zeitpunkt und Intensität der Androgeneinwirkung verschiedene Urogenitaltypen der Intersexualität zeigen kann (1; 38; 39; 42; 47). Nach der 16. Embryonalwoche kann nur noch eine Clitorisvergrößerung erfolgen (OVERZIER (39)). Die stärkste Virilisierungserscheinung findet man entsprechend dem Schweregrad des Enzymdefekts beim Salzverlustsyndrom. (PRADER (47)).

Beim Knaben fällt lediglich eine isosexuelle Pseudopubertas praecox im Kleinkindesalter auf, worin sicher ein Grund für die seltenere Diagnose "AGS" bei Knaben zu sehen ist, was auch von allen Autoren, die Zahlenverhältnisse angeben, betont wird. (BLIZZARD und WILKINS (3) geben ein Verhältnis von $\sigma/\varphi = 0,28$ an; CHILDS et al. (12) ein Verhältnis von $\sigma/\varphi = 0,43$, beim Salzverlustsyndrom 0,65; PRADER (44): $\sigma/\varphi = 0,54$, beim Salzverlustsyndrom 0,95).

Das ausgeglichene Verhältnis beim Salzverlustsyndrom beruht sicher auf den klinisch im Vordergrund stehenden lebensbedrohlichen Elektrolytkrisen, welche die Kinder oft schon im frühen Säuglingsalter in ärztliche Behandlung führen.

Die Angaben über den Anteil des Salzverlustsyndroms

am AGS insgesamt schwanken, er ist jedoch in den letzten Jahren, wohl durch genauere Kenntnis und verbesserte Diagnostik stetig steigend (PRADER (44)). Die meisten Autoren geben Zahlen zwischen 1/4 aller Fälle (1; 31; 59) und 1/3 bzw. 30% (3; 7; 57; 64) an. PRADER bezeichnet schon 1962 Salzverlustform als die häufigste Form des AGS (46).

Die übrigen Enzymdefekte in der Synthese der NNR-Steroide (Defekte der C-11-Hydroxylase, der 3 β -ol-Dehydrogenase, der 20,22-Desmolase, der C-17-Hydroxylase und C-18-Dehydrogenase) sind selten (4; 5; 31; 43; 64) und sollen hier nur erwähnt werden. Einen Überblick über die Lokalisation der verschiedenen Enzymdefekte gibt Tabelle 1, S.8.

Entscheidend für den Nachweis des AGS ist die Analyse der Steroidausscheidungen im 24-Std.Urin. Neben der Erhöhung der 17-Ketosteroide (Gruppenreaktion für mehrere Androgenmetaboliten) und der 17-Hydroxycorticosteroide ("Totale 17 OHCS" nach Appleby/Gibson, Gruppenreaktion für Metaboliten der Cortisolsynthese und des Cortisols) ist die Erhöhung von Pregnantriol (Metabolit des 17 α -Hydroxyprogesterons) für das AGS charakteristisch und von großer diagnostischer Bedeutung. (BONGIOVANNI et al. (5; 7; 8), WILKINS (59)). Pregnantriolon (= 11-Ketopregnantriol) ist noch spezifischer für den C-21-Hydroxylase-Defekt (BONGIOVANNI et al.(9), FINKELSTEIN (19)), da es unter physiologischen Bedingungen nur in Spuren im Harn ausgeschieden wird.

Die kausale Therapie des unkomplizierten AGS besteht in der lebenslänglichen Cortisolsubstitution, die 1950 von WILKINS et al.(60; 61) eingeführt wurde. An die Stelle des ursprünglich verwendeten Cortisons traten später die

synthetischen, stärker wirksamen Glucocorticoide Prednison, Prednisolon, 6-Methylprednisolon, die entsprechend niedriger dosiert werden (1; 3; 31; 40). Von der Anwendung von Dexamethason (9 α -Fluor-16 α -Methyl-Prednisolon) in der Therapie des AGS raten die meisten Autoren ab (1; 27; 40). HUBBLE (28) empfiehlt es wegen der starken antiandrogener Wirkung als Medikament der Wahl bei Patienten, die spät zur Behandlung kommen, da es die Knochenreifung stärker als das Längenwachstum hemmt.

Seit einigen Jahren wird jedoch wieder das 'physiologische' Hydrocortison oder Cortison vorgezogen (2; 27; 49; 55; 64), da hiermit die günstigsten Ergebnisse im Körperwachstum erzielt werden können (43; 49; 64). Die Wachstumskontrolle ist das wichtigste Kriterium für die Therapieüberprüfung (O. BUTENANDT (10)).

Beim Salzverlustsyndrom sind zusätzlich Mineralocorticoidgaben sowie erhöhte Kochsalzzufuhr notwendig. Beides kann jedoch nach den ersten Lebensjahren im allgemeinen langsam abgebaut werden (1; 2; 3; 31; 40; 43; 62; 64).

Beim Übergang der Pseudopubertas praecox in eine pubertas praecox vera bei AGS-Patienten werden bei beiden Geschlechtern Antiandrogene in die Therapie einbezogen. (Cyproteronacetat mit gestagener Teilwirkung und anti-gonadotropem Effekt). (NEUMANN, STEINBECK (36)).

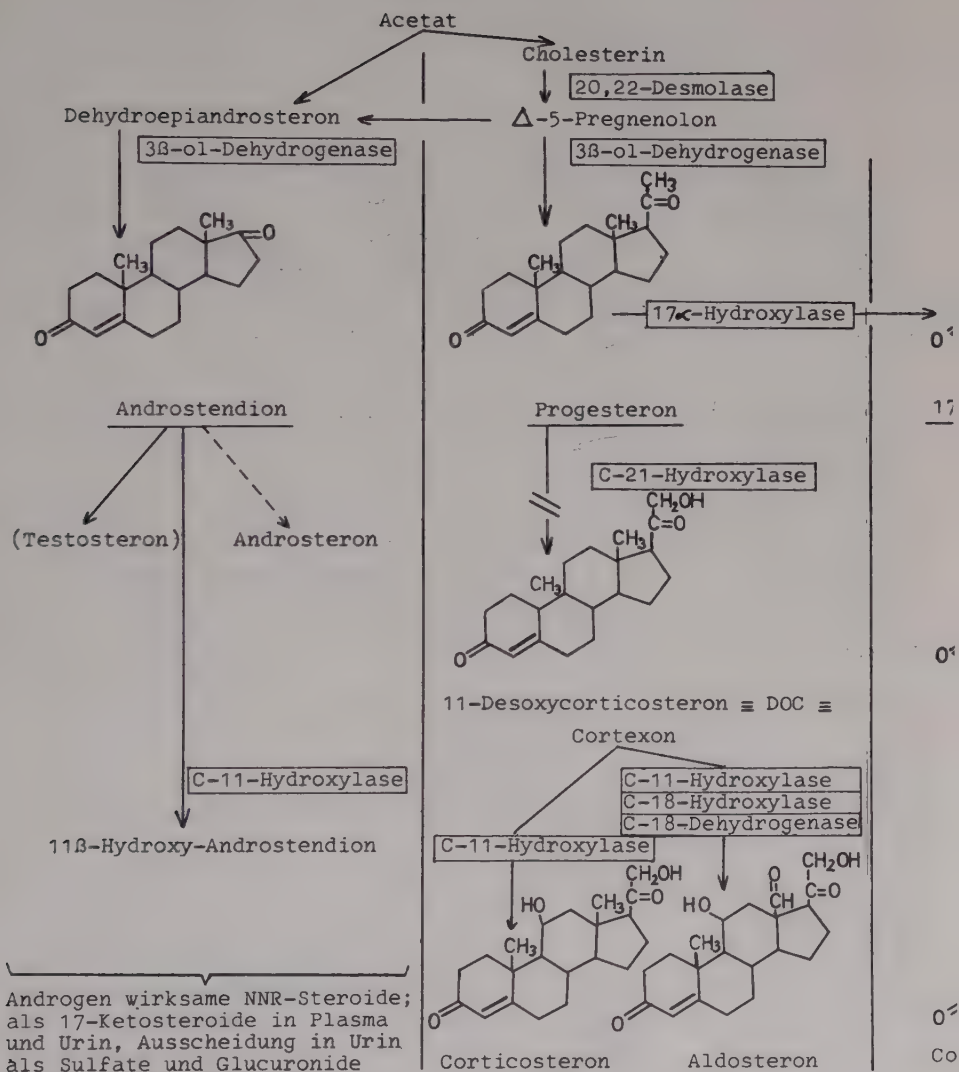
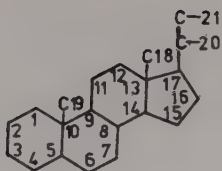
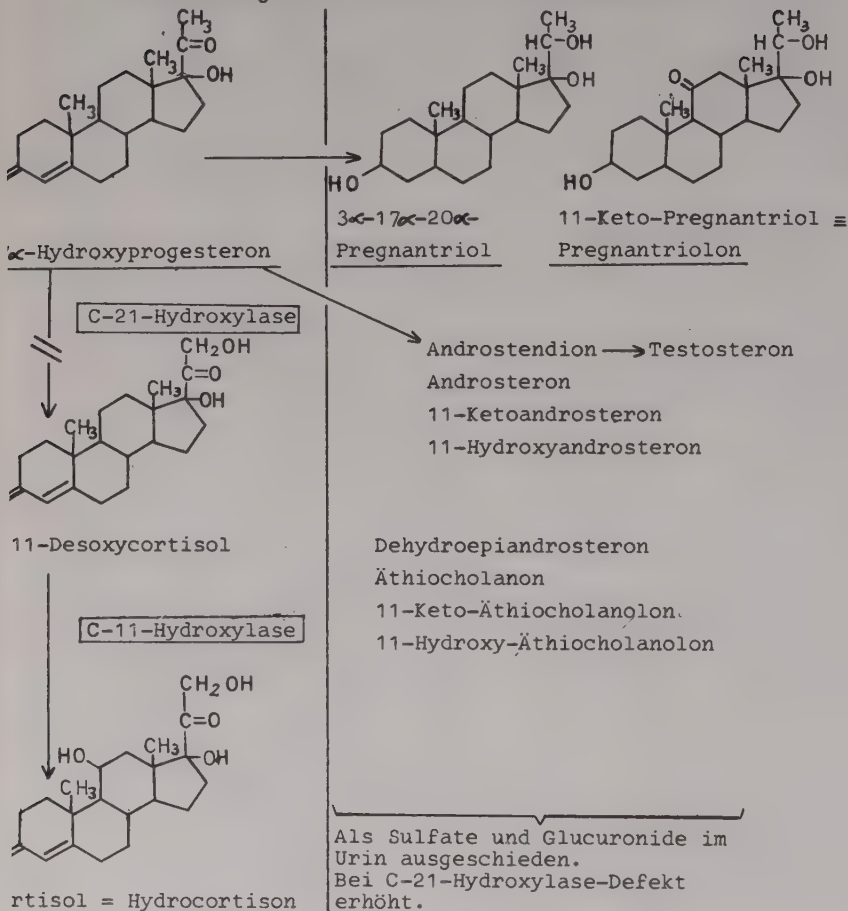


Tabelle 1: Darstellung des C-21-Hydroxylase-Defektes in der Cort

(In Anlehnung an (62) Keller/Wiskott: Lehrbuch der Ki



Nummerierung der C-Atome am Steroid-Molekül



isol- und Mineralocorticoidsynthese.

nderheilkunde, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1969)

C.I. Analysengang und Methode zur Bestimmung von Pregnantriol und Pregnantriolon im 24-Std.Urin.

a) Material und Apparaturen:

Verwendet wurden:

Dichromat-Schwefelsäure-gereinigte Glaskolben, Glas-trichter, Reagenzgläser, Pipetten. Glassäulen mit einge-schmolzenen Fritten (innerer Durchmesser 10 mm). 10 µl-Spritzen (Hamilton).

Chemikalien (alle verwendeten Reagenzien p.A.):

Eisessig; Na-Acetatlösung 2 mol.; Essigsäure; NaOH; Na-Acetatpuffer (1 molar, pH 5,4); Chloroform; Diäthyl-äther; Na₂CO₃ gesättigt; Na₂SO₄ wasserfrei; Benzol; Ätha-nol; Methanol; Essigsäureäthylester; deaktiviertes Alumi-nium-Oxyd 3% H₂O (Merck Nr.1097, Stand. nach Brockmann), Seesand (gereinigt und gegläht); Hexamethyldisilazan; Trimethylchlorsilan; Isooctan.

Ketodase[®] (standardisierte, acetatgepufferte, auf pH 5 eingestellte Lösung von β-Glucuronidase. 1ml ≅ 5000 Fishman-Units).

Standardisierte Lösung von Pregnantriol	(1 mg/ml)
Pregnantriolon	(1 mg/ml)
Oestron	(1 mg/ml).

Apparaturen:

pH-Meter zur Einstellung der Urinproben auf pH 6;
Schütteltrichter für Ätherextraktion und Alkaliwäsche;
Für die Gaschromatographie (GLC):

Gaschromatograph PACKARD INSTRUMENTS, Mod. Nr. 780.

Arbeitstemperatur: 220 °C; Meter Range: 1 x 10⁻⁹Amp.

(Vollausschlag).

Gasfluß: Carrier (= N₂-Trägergasstrom): 40 ml/min

FID: H₂ : 40 ml/min

O₂ : 250 ml/min

Saugspannung: 100 V .

b) Analysengang und Methode:

1. Sammlung und Konservierung des 24-Std.-Urins.
2. Enzymatische Hydrolyse der als Glucuronide vorliegenden Steroide.
3. Ätherextraktion der ursprünglich freien und der nun dekonjugierten Steroide. Reinigung der Ätherextrakte durch Alkaliwäsche und Wasser.
4. Säulenchromatographische Auftrennung der verbliebenen Steroide in verschiedene Gruppen.
5. Silanisierung zur Stabilisation der Steroide in der weiterverarbeiteten Fraktion.
6. Gaschromatographische Bestimmung und rechnerische Auswertung der erhaltenen Chromatogramme.

Ad 1: Sammlung und Konservierung des 24-Std.-Urins :

Sammlung in 1 l Flaschen, denen jeweils ein konservierendes Gemisch von 2 ml Chloroform und 50 ml Essigsäure/Natriumacetatpuffer (pH 4,0) zugesetzt wurde.

Ansetzen des Puffergemischs:

180 ml Eisessig auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen.

Davon 820 ml nehmen und 180 ml 2 molare Natriumacetatlösung hinzufügen.

Von allen 24-Std. Urinen wurden 2 Proben A und B unter völlig gleichen Bedingungen untersucht.

Ad 2: Enzymatische Hydrolyse der glucuronierten Steroide :

25 ml Urin in Glaskolben. Einstellen auf pH 6 mit

Essigsäure/NaOH. Dazu

2,5 ml (= 1/10 des Volumens) Na-Acetatpuffer
(1 molar, pH 5,4).

0,125 ml Chloroform (5 ml/1000) zur Aktivierung der
 β -Glucuronidase (22), und zur Konservierung (GLEIS-
PACH (22), CURTIUS et al.(14)).

5 ml Ketodase [®] (5 ml Ketodase [®] $\hat{=}$ 25 000 Fishman-
Units).

Abdecken der Kolbenöffnung mit Parafilm.

48 Std. Inkubation bei 37 °C.

Die schonende enzymatische Hydrolyse verhindert die Bil-
dung von Steroidartefakten (BONGIOVANNI et al.(8)).

Ad 3: Extraktion der ursprünglich freien und der nun de-
konjugierten Steroide. Reinigung der Ätherextrak-
te durch Alkaliwäsche.

a) Extraktion:

Mit 2 x 50 ml Diäthyläther (damit beste Steroidausbeute,
GLEISPACH (22)) im Schütteltrichter, jeweils 3 Minuten.
Auffangen und Weiterverarbeitung der 100 ml Ätherextrakt.

b) Alkaliwäsche:

(Zur Befreiung des Extrakts von organischen Säuren und
einem Großteil der Oestrogene).

Ebenfalls im Schütteltrichter, Dauer für jeden Waschvor-
gang 3 Minuten. 2 x 25 ml gesättigtes Na₂CO₃. 2 x 30 ml
Aqua dest. Trocknen des gereinigten Extraktes im Filter
mit Na₂SO₄ wasserfrei, dabei Überführung in Rundkolben.
Anschließend im Rotationsverdampfer Herstellung eines
Trockenextrakts.

Ad 4: Säulenchromatographische Auftrennung der verbliebe-
nen Steroide in verschiedene Fraktionen.

Im Trockenextrakt sind neben den uns interessierenden

Pregnanderivaten noch verschiedene andere Steroide (Cholesterin, Testosteron, 17-Ketosteroide, Oestrogen-Reste und Farbstoffe) enthalten. Eine weitere Reinigung ist erforderlich, um in der gaschromatographischen Analyse das Auftreten unerwünschter Peaks weitgehend zu vermeiden.

Durchführung:

Füllen der Säulen vor der Chromatographie mit 5 ml Benzol und 2 g deaktiviertem Aluminiumoxyd 3% H₂O. (Das Aluminiumoxyd steht ca. 30 mm hoch in der Säule). Abdecken des Al-Oxyds mit einer Spatelspitze gereinigtem und geglühtem Seesand. Auflösen der Proben in 2 x 5 ml Benzol und vorsichtiges Aufbringen auf die Säule.

Successive Eluierung der Steroide:

Fraktion I mit 25 ml 0,8% Äthanol/Benzol-Gemisch; enthält 17 KS, Testosteron.

Fraktion II mit 15 ml 3,0% Äthanol/Benzol; enthält Pregnandiol.

Fraktion III mit 20 ml 20,0% Äthanol/Benzol; enthält Pregnantriol und Pregnantriolon.

Bei Verwendung einer neuen Charge Aluminiumoxyd wurde die Lage der einzelnen Fraktionen vorher kontrolliert.

Auffangen von Fraktion III, Hinzufügen des internen Standards: 25 µg Oestron. Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum-Exsikator.

Trockenextrakt mit 3 ml (erst 2 ml, dann 1 ml) Methanol oder Essigsäureäthylester in Spitzgläser überführen, Verschuß mit Schliffstöpsel.

Präparation des externen Standards für die Gaschromatographie: 2 Proben St₁ und St₂. Jedes Standardröhrchen enthält: 50 µg Pregnantriol, 50 µg Pregnantriolon, 50 µg Oestron.

Unter Stickstoff wird das Lösungsmittel von Proben und Standard bei ca. 40 °C abgeblasen.

Ad 5: Silanisierung zur Stabilisierung der eluierten Steroide für die Gaschromatographie.

Jedem Röhrchen werden

100 µl Hexamethyldisilazan und 10 µl Trimethylchlorsilan (Katalysator) zugesetzt und anschließend kräftig gemischt. Reaktionsdauer 1 Std. bei 60 °C.

Die Silanisierung soll möglichst unmittelbar vor der Gaschromatographie erfolgen (53), auf unbedingte Wasserfreiheit ist zu achten, da sich sonst die gebildeten Silyl-äther zersetzen (22).

Ad 6: Gaschromatographische Bestimmung und Auswertung von Pregnantriol und Pregnantriolon.

Auflösen des Standards und der Proben in Isooctan.

Die Standards wurden im allgemeinen in 100 µl Isooctan aufgelöst, bei den Proben wurde mit einer Auflösung in 50 µl Isooctan begonnen und gegebenenfalls weiter verdünnt. Alle Injektionen auf den Einspritzblock wurden mit 10 µl-Spritzen (Hamilton) vorgenommen, es wurden jeweils 5 µl aufgespritzt.

Rechnerische Auswertung der Chromatogramme:

Sie erfolgt unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung durch Ausmessen der Peakhöhe von einer Grundlinie aus, mit der die beiden Fußpunkte der Zacke verbunden werden.

a) Berechnung der Pregnantriol/Pregnantriolon-Ausscheidung in [µg/d] :

$$x \text{ [µg/d]} = \frac{2,5 \text{ [µg]} \cdot \text{Peakhöhe Probe [mm]} \cdot y \text{ [µl] Isooctanlösg.}}{\text{Peakhöhe Standard [mm]} \cdot 5 \cdot 25}$$

aufgefüllte 24-Std.-Urin [mm]

Anmerkung:

Zähler: 2,5 [µg] entspricht der mit 5 µl aufgespritzten
Standardmenge (50/100 = 2,5 µg in den
aufgespritzten 5 µl).

y [µl] Isooctan entsprechen der Lösungsmenge der
Proben.

Nenner: 5 = aufgespritzte Probenlösung in µl
25 entspricht den 25 ml eingesetzten 24-Std.-
Urins.

b) Korrektur der Wiederfindung der GLC durch den internen
Oestron-Standard:

$$\text{Korrekturfaktor } F = \frac{O_1 \text{ (Peakhöhe Standard)} \cdot 100 \cdot 5}{O_2 \text{ (Peakhöhe Probe)} \cdot 5 \cdot y}$$

· C.II. Vorversuche .

1. Vergleich der Ausbeute an Pregnantriol und Pregnantriolon desselben 24-Std.-Urins nach enzymatischer Hydrolyse mit

- a) β -Glucuronidase und Arylsulfatase, und
- b) nur mit β -Glucuronidase.

Die NNR-Steroidmetaboliten werden im Urin hauptsächlich als Glucuronide und Sulfate ausgeschieden, Pregnantriol vorwiegend als Glucuronid (GLEISPACH (22)).

Es sollte in diesem Vorversuch geprüft werden, ob die Verwendung einer Kombination von β -Glucuronidase und Arylsulfatase in der enzymatischen Hydrolyse eine deutlich höhere Ausbeute an Pregnantriol und Pregnantriolon erbringt, als die alleinige Verwendung der β -Glucuronidase, die zur Routineanalyse im Endokrinologischen Labor der Universitäts-Kinderklinik München verwendet wird. Die Sulfatasen sind einmal sehr teuer, und erschweren zum anderen die folgende Extraktion durch Emulsionsbildung (GLEISPACH (22)).

Beim Analysengang wurde genau so verfahren, wie es unter C.I.2. beschrieben ist, es wurden äquivalente Enzymmengen für die Hydrolyse desselben 24-Std.-Urins eingesetzt:

5 ml Glucuronidase (Ketodase[®]) $\cong$ 0,25 ml Glucuronidase/Arylsulfatase.

Mit beiden Enzymen werden jeweils 2 Proben desselben 24-Std.-Urins untersucht (Doppelwerte):

A₁/A₂ mit 0,25 ml β -Glucuronidase/Arylsulfatase

B₁/B₂ mit 5 ml β -Glucuronidase.

Ergebnis:

Nach Hydrolyse mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase waren

Pregnantriol	A ₁ :	7320 μ g/d
"	A ₂ :	9640 μ g/d
Pregnantriolon	A ₁ :	977 μ g/d
"	A ₂ :	786 μ g/d

Die Hydrolyse mit β -Glucuronidase (Ketodase[®]) ergab:

Pregnantriol	B ₁ :	11502 μ g/d
"	B ₂ :	11871 μ g/d
Pregnantriolon	B ₁ :	986 μ g/d
"	B ₂ :	1009 μ g/d

Der Vergleich ergab, daß die Ausbeute der uns interessierenden Steroide bei der Verwendung von Glucuronidase/Arylsulfatase keineswegs besser ist, und die Übereinstimmung der Doppelwerte von Pregnantriol und Pregnantriolon ist nach der Hydrolyse mit Ketodase[®] wesentlich größer. Nach diesem Vorversuch wird Ketodase[®] auch für den ACTH-Belastungstest verwendet.

2. Vor dem geplanten ACTH-Belastungstest bei Erwachsenen stellt sich die Frage, ob das für die Pregnantriol und Pregnantriolon-Untersuchung bei Kindern in unserem Labor verwendete Oestron als Standard-Maß für die Wiederfindung nach der Gaschromatographie und die Korrektur der Meßwerte brauchbar ist.

Es war zu untersuchen, ob eventuell körpereigenes Oestron, das die Alkaliwäsche passiert hat (Einzelheiten der Analysmethode siehe unter C.I.4) auch die säulenchromatographische Steroidauftrennung bis in die Pregnantriol-

Versuchsanordnung im übrigen wie oben.

Standard : Tritium-markiertes Oestron ($\sim 32\ 000$ CPM in $100\ \mu\text{l}$)

Ergebnis: Die Hauptmenge des eingesetzten Oestrone wird, wie erwartet, bereits bei den ersten beiden Fraktionen eluiert.

Leerwerte	1)	2288 C/10 min
	2)	5504 C/10 min

Aufgegebene Menge:	308961 C/10 min
--------------------	-----------------

1. Fraktion	A:	156162 C/10 min
	B:	190433 C/10 min

2. Fraktion	A:	19633 C/10 min
	B:	15523 C/10 min

3. Fraktion	A:	8847 C/10 min
(Pregnantriol)	B:	9800 C/10 min

Die Wiederfindungswerte des Oestrone in der Pregnantriol-fraktion stimmen in etwa mit denen des Versuchs a) (3,1 - 3,8 %) überein, liegen sogar etwas niedriger.

Auf Grund dieser Untersuchung kann Oestron auch bei den geplanten Steroid-Untersuchungen an Erwachsenen als interner Standard verwendet werden.

C.III. Durchführung eines ACTH-Belastungsversuchs an mut-
maßlich genetisch unbelasteten Erwachsenen im
generationsfähigen Alter und an Eltern bekannter
AGS-Patienten.

In der Gruppe A wurden 5 ♂ und 5 ♀ gesunde Vergleichs-
personen untersucht.

In der Gruppe B 4 Väter und 4 Mütter bekannter AGS-
Patienten.

Auf eine weitere Aufgliederung der kleinen Kollektive
bezüglich Alter, Körpergewicht und Größe wurde verzichtet,
bei den ♀ Versuchspersonen blieben die Zyklusphase zum
Zeitpunkt der Untersuchung, sowie der mögliche Einfluß
von Ovulationshemmern unberücksichtigt.

Es wurde darauf geachtet, daß alle Probanden am ersten
Versuchstag (dem Tag o h n e exogene ACTH-Belastung) sich
keiner ungewöhnlichen körperlichen Belastung aussetzten,
um die Leerwerte nicht unter Streßbedingungen zu sammeln.
Alle Probanden waren zum Zeitpunkt des Versuchs gesund,
lediglich ein AGS-Vater hatte wegen einer Meniskusverlet-
zung einen Gipsverband.

Die korrekte Sammlung eines 24-Std.-Urins wurde allen
Probanden erklärt, und auch gewissenhaft durchgeführt.

- 1.Versuchstag: Sammlung eines 24-Std.-Urins von allen Pro-
banden ohne exogene Stimulation der NNR.
- 2.Versuchstag: Alle Probanden erhielten morgens 2 mg Cor-
trophin-S Depot [®] (Fa.Organon) tief i.m. injiziert.
Mit dieser Dosis war - unabhängig von Körpergröße und
Gewicht - eine maximale Stimulation der NNR bei allen
Probanden gewährleistet. Anschließend an die Injektion
erneut Sammlung eines 24-Std.-Urins.

3.Versuchstag: Von 5 Probanden der Gruppe A (2 ♂ und 3 ♀) sowie von allen 8 Probanden der Gruppe B (4 ♂ und 4 ♀) wurden ohne erneute ACTH-Belastung am Tag n a c h der Injektion ein dritter 24-Std.-Urin gesammelt.

Bestimmt wurden in allen 24-Std.-Urinen die Ausscheidung von

1.Pregnantriol (3α - 17α - 20α -Pregnantriol), der direkten Abbaustufe von 17α -Hydroxyprogesteron.

2.Pregnantriolon (= 11-Ketopregnantriol), das bei C-21-hydroxylase-Insuffizienz durch 'vorzeitige' Hydroxylierung entsteht, d.h., anders als im Normalfall, v o r der C-21-Hydroxylierung. Das dadurch entstehende 21-Desoxycortisol kann nicht (FINKELSTEIN (19), GLEISPACH (23)) oder nur in ganz geringen Mengen (FINKELSTEIN (19)) in Cortisol umgewandelt werden, und wird als Pregnantriolon im Urin ausgeschieden.

D.I. Auswertung und Darstellung der erhaltenen Pregnantriol- und Pregnantriolon-Werte.

Gruppe A : 10 mutmaßlich gesunde Probanden (5 ♂ und 5 ♀).

Gruppe B : 8 heterozygot belastete Probanden (4 ♂ und 4 ♀).

Untergruppen A₁, A₂, A₃ und B₁, B₂, B₃ .

	Versuchstag	Zahl n der Probanden (24-Std.-Urin)
A ₁	1	10
A ₂	2	10
A ₃	3	5 (2 ♂, 3 ♀)
B ₁	1	8
B ₂	2	8
B ₃	3	8

Von allen 24-Std.-Urinen wurden jeweils Doppelwerte analysiert, deren Mittelwerte $\bar{x}$ der Dokumentation zugrunde liegen.

Es wurde errechnet:

- Die Mittelwerte $\bar{x}$ aus den Doppelbestimmungen für alle Probanden der Gruppe A_{1,2,3} und B_{1,2,3}.
 Von 49 Doppelbestimmungen für Pregnantriol lagen die Differenzen der Einzelwerte bei 32 Bestimmungen unter 10%, bei 21 Bestimmungen unter oder bei 5%.
 Bei Pregnantriolon liegen die Differenzen der einzelnen Wertpaare teilweise wesentlich höher. Dies ist auf die insbesondere bei den Leerwerten oft winzigen, kaum auszuwertenden Peaks zurückzuführen , außerdem fallen bei den häufig sehr niedrigen Pregnantriolonausscheidungen Differenzen der Einzelwerte prozentual stärker ins Gewicht.

- 2) Der Mittelwert in den Gruppen $A_{1,2,3}$ und $B_{1,2,3}$ nach der Formel $\frac{\sum \bar{x}}{n}$.

- 3) Wie bei anderen Steroidanalysen (KNORR (33), VOIGT et al.(58)) die Standardabweichung nach der Formel

$$s = \sqrt{\frac{s(x^2) - \frac{s(x)^2}{n}}{(n-1)}} \quad (\text{wobei } s \hat{=} \sum).$$

- 4) Der Variationskoeffizient $v = \sqrt{\frac{\sum (\Delta^2)}{2n}}$, wobei

Δ = Differenz der Einzelwerte der Doppelbestimmung in %. Ferner zum genaueren Vergleich der Kollektive der

- 5) Anstieg der Pregnantriol- und Pregnantriolon-Ausscheidung ($\mu\text{g/d}$) am 2. und 3. Versuchstag in Bezug auf den Ausgangswert für alle Probanden der Gruppe A_2 , A_3 und B_2 , B_3 .

- 6) Signifikanz - Prüfung (t-Test):

Die Signifikanzprüfung der Pregnantriol- und Pregnantriolonwerte an den 3 Versuchstagen und des Anstiegs der Pregnantriol- und Pregnantriolonausscheidungen am 2. und 3. Versuchstag (Absolutwerte) erfolgte unter Anwendung der folgenden Formel:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2(n_1-1) + s_2^2(n_2-1)}{n_1 + n_2 - 2} \cdot \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

p = Irrtumswahrscheinlichkeit für die Annahme, daß sich die arithmetischen Mittelwerte zweier Kollektive signifikant unterscheiden. Freiheitsgrade: $(n_1 + n_2) - 2$.

1. Pregnantriol:

Tabelle 2: Mittelwerte $\bar{x}$ aus den Doppelbestimmungen von Pregnantriol im 24-Std.-Urin der Probanden am 1.Versuchstag (ohne ACTH-Belastung). Gruppenmittelwerte. Standardabweichung s der Gruppe A_1 und B_1 . t - Test.

Gruppe	Prob. Nr.	♂/♀	Pregnantriol $\mu\text{g/d}$	Gruppe	Prob. Nr.	♂/♀	Pregnantriol $\mu\text{g/d}$
A_1 ($n=10$)	1	♂	748	B_1 ($n=8$)	1	♂	1057
	2	♂	415		3	♂	582
	4	♂	877		5	♂	4718
	6	♂	2757		7	♂	606
	8	♂	1793		2	♀	1136
	3	♀	581		4	♀	86
	5	♀	136		6	♀	136
	7	♀	714		8	♀	578
	9	♀	2679		-	-	-
	10	♀	273		-	-	-
Pregnantriol $\mu\text{g/d}$				Pregnantriol $\mu\text{g/d}$			
Gruppenmittelwert: 1097				Gruppenmittelwert: 1112			
Max. Wert:				Max. Wert:			
(Prob. 6, ♂, 23 J.): 2752				(Prob. 5, ♂, 35 J.): 4718			
Min Wert:				Min Wert:			
(Prob. 5, ♀, 37 J.): 136				(Prob. 4, ♀, 29 J.): 86			
Standardabweichung:				Standardabweichung:			
für Gruppe A_1				für Gruppe B_1			
$s = 926,8 \mu\text{g/d}$				$s = 1504 \mu\text{g/d}$			
$t = 0,02$							

Beurteilung:

In beiden Gruppen erhebliche Streubreite der einzelnen Werte. Die Gruppenmittelwerte von A und B sind praktisch identisch. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kollektiven ($t = 0,02$)

Tabelle 3: Mittelwerte $\bar{x}$ aus den Doppelbestimmungen von Pregnantriol am 2. Versuchstag (nach ACTH-Belastung). Gruppenmittelwerte. Standardabweichung s der Gruppen A_2 und B_2 . t - Test.

Gruppe	Prob. Nr.	♂/♀	Pregnantriol µg/d	Gruppe	Prob. Nr.	♂/♀	Pregnantriol µg/d
A ₂ (n=10)	1	♂	1321	B ₂ (n=8)	1	♂	3126
	2	♂	1352		3	♂	4476
	4	♂	1935		5	♂	6950
	6	♂	3718		7	♂	4295
	8	♂	1918		2	♀	4405
	3	♀	2283		4	♀	2539
	5	♀	1246		6	♀	1175
	7	♀	2439		8	♀	3670
	9	♀	3775		-	-	-
	10	♀	1900		-	-	-
Pregnantriol µg/d				Pregnantriol µg/d			
Gruppenmittelwert: 2189				Gruppenmittelwert: 3830			
Max. Wert:				Max. Wert:			
(Prob. 9, ♂, 28 J.): 3775				(Prob. 5, ♂, 35 J.): 6950			
Min. Wert:				Min. Wert:			
(Prob. 5, ♂, 37 J.): 1247				(Prob. 6, ♀, 34 J.): 1175			
Standardabweichung:				Standardabweichung:			
für Gruppe A ₂				für Gruppe B ₂			
s = 912,1 µg/d				s = 1687,6 µg/d			
t = 2,65 = p < 0,02							

Beurteilung:

Die Mittelwerte beider Gruppen differieren erheblich, insbesondere im Vergleich zum 1. Versuchstag. Der niedrigste aller Werte nach Belastung liegt in der Gruppe B_2 , also bei einer heterozygoten Probandin.

Die Signifikanz-Prüfung ergibt: $t = 2,65$. Das zugehörige p für zweiseitige Verteilung ist $< 0,02$. D.h., die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Annahme, daß sich die Absolut-Werte der beiden Kollektive A und B signifikant unterscheiden, beträgt 2%.

Es besteht also unter ACTH-Belastung ein signifikant unterschiedliches Verhalten beider Kollektive.

Tabelle 4: Mittelwerte $\bar{x}$ aus den Doppelbestimmungen von Pregnantriol am 3.Versuchstag (ohne erneute Stimulation der NNR). Gruppenmittelwerte. Standardabweichung s der Gruppen A_3 und B_3 . t -Test.

Gruppe	Prob. Nr.	♂/♀	Pregnantriol µg/d	Gruppe	Prob. Nr.	♂/♀	Pregnantriol µg/d
A ₃ (n=5)	1	♂	4493	B ₃ (n=8)	1	♂	2035
	2	♂	1887		3	♂	3129
	3	♀	4915		5	♂	7646
	5	♀	2130		7	♂	7400
	10	♀	3570		2	♀	7307
	-	-	-		4	♀	2299
	-	-	-		6	♀	963
	-	-	-		8	♀	5495
	Pregnantriol µg/d				Pregnantriol µg/d		
	<u>Gruppenmittelwert:</u> 3399				<u>Gruppenmittelwert:</u> 4534		
Max.Wert:			Max.Wert:				
(Prob.3,♀, 23 J.):4195			(Prob.5,♂, 35 J.):7646				
Min.Wert:			Min.Wert:				
(Prob.2,♂, 25 J.):1887			(Prob.6,♀, 34 J.): 939				
<u>Standardabweichung:</u>			<u>Standardabweichung:</u>				
für Gruppe A ₃			für Gruppe B ₃				
s = 1362 µg/d			s = 2749,5 µg/d				

t = 0,85

Beurteilung:

In der Gruppe B stellt Proband Nr.5 an allen 3 Tagen die Maximalwerte, in Gruppe A ist ein solches Verhalten eines einzelnen Probanden nicht festzustellen. Es fällt auf, daß die Minimalwerte an beiden Belastungstagen von derselben Probandin (Nr.6) der Gruppe B gestellt werden, in Gruppe A jedoch von verschiedenen Probanden. Die Standardabweichung der Gruppe B_3 ist mehr als doppelt so hoch wie die der Gruppe A_3 . Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Kollektiven ($t = 0,85$).

Variationskoeffizient für 49 Pregnantriol-Doppelbestimmungen:

$$v = 10,2 \%$$

Die methodische Streubreite liegt also bei 10 %.

Tabelle 5: Anstieg der Pregnantriol-Ausscheidung ($\mu\text{g/d}$) am 2. und 3. Versuchstag in Bezug auf die Ausgangswerte. t-Test.

Gruppe A				Gruppe B			
Prob. Nr.	$\sigma/\varnothing$	Pregnantriolanstieg $\mu\text{g/d}$		Prob. Nr.	$\sigma/\varnothing$	Pregnantriolanstieg $\mu\text{g/d}$	
		2.Tag	3.Tag			2.Tag	3.Tag
1	σ	574	3745	1	σ	2069	978
2	σ	937	1472	3	σ	3894	2546
4	σ	1058	-	5	σ	2232	2928
6	σ	961	-	7	σ	3689	6794
8	σ	125	-	2	$\varnothing$	3270	6172
3	$\varnothing$	1703	4334	4	$\varnothing$	2453	2212
5	$\varnothing$	1110	1994	6	$\varnothing$	1039	827
7	$\varnothing$	1725	-	8	$\varnothing$	3092	4917
9	$\varnothing$	1097	-	-	-	-	-
10	$\varnothing$	1627	3297	-	-	-	-

Für 2. Versuchstag: $t = 4,66 \approx p < 0,001$

Für 3. Versuchstag: $t = 0,40$

Beurteilung:

Die Absolutwerte liegen nach ACTH-Belastung bei allen Probanden der Gruppe B mehr als 1000 μg über dem Ausgangswert, in Gruppe A nur bei 6 von 10 Probanden. Der größtenteils noch wesentlich höhere Pregnantriolanstieg am 3. Versuchstag weist auf die Notwendigkeit einer generellen Untersuchung

der Pregnantriolausscheidung am Tag nach der eigentlichen NNR-Stimulation bei Verwendung von ACTH-Depot-Präparaten hin.

Die Signifikanz-Prüfung ergab für den 2. Versuchstag :
 $t = 4,66$.

Das zugehörige p für zweiseitige Verteilung ist $< 0,001$.
D.h., die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Annahme, daß der Anstieg der Pregnantriolausscheidung am 2.Versuchstag in beiden Kollektiven signifikant unterschiedlich ist, beträgt 0,1%.

Es besteht also unter ACTH-Belastung am 2.Versuchstag ein signifikant unterschiedlicher Anstieg der Pregnantriolausscheidung in beiden Kollektiven.

Am 3.Versuchstag (ohne erneute ACTH-Stimulation) besteht hingegen kein signifikanter Unterschied im Anstieg der Pregnantriolausscheidungen zwischen Gruppe A und B.

Graphische Darstellung des Pregnantriol-Anstiegs bei gesunden Vergleichspersonen und AGS-Eltern siehe Abb.1 .

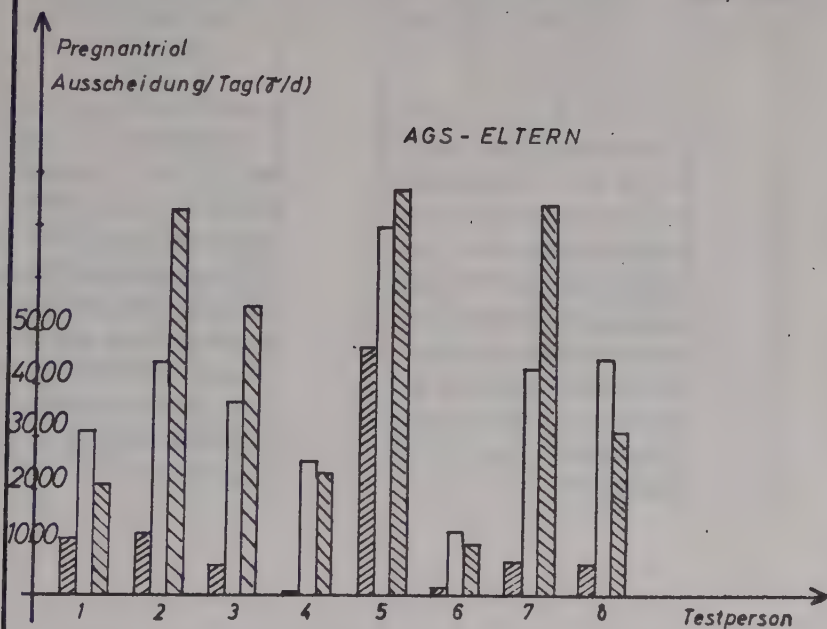
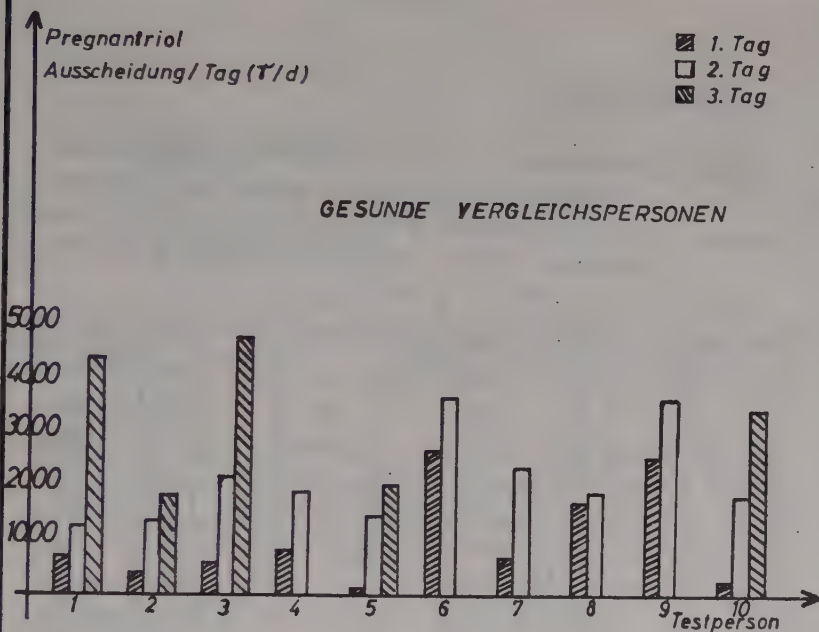


ABB. 1 PREGNANTRIOLANSTIEG NACH
ACTH-INJEKTION

2. Pregnantriolon:

Tabelle 6: Mittelwert $\bar{x}$ aus den Doppelbestimmungen von Pregnantriolon im 24-Std.-Urin der Probanden am 1. Versuchstag (ohne ACTH-Belastung). Gruppenmittelwerte. Standardabweichung s der Gruppen A_1 und B_1 . t-Test.

Gruppe	Prob. Nr.	♂/♀	Pregnantriolon $\mu\text{g/d}$	Gruppe	Prob. Nr.	♂/♀	Pregnantriolon $\mu\text{g/d}$
A_1 (n=10)	1	♂	118	B_1 (n=8)	1	♂	139
	2	♂	70		3	♂	44
	4	♂	≤ 20		5	♂	104
	6	♂	118		7	♂	≤ 20
	8	♂	114		2	♀	50
	3	♀	≤ 20		4	♀	39
	5	♀	≤ 20		6	♀	21
	7	♀	≤ 20		8	♀	≤ 20
	9	♀	≤ 20	-	-	-	-
	10	♀	≤ 20	-	-	-	-
Pregnantriolon $\mu\text{g/d}$ Bei 6 der 10 Probanden lag die Pregnantriolonausscheidung unter der <u>Nachweisgrenze</u> ($\sim 20 \mu\text{g/d}$). Für die Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung wurden ihre Pregnantriolonausscheidung mit $\rightarrow 0$ angenommen.				Pregnantriolon $\mu\text{g/d}$ Bei 2 der 8 Probanden lag die Pregnantriolonausscheidung unter der <u>Nachweisgrenze</u> ($\sim 20 \mu\text{g/d}$). Für die Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung wurden ihre Pregnantriolonausscheidung mit $\rightarrow 0$ angenommen.			

./.

Fortsetzung von Tabelle 6:

<u>Gruppenmittelwert:</u> 41 <u>Max.Wert:</u> (Prob.6,♂, 23 J.): 118 <u>Standardabweichung:</u> für Gruppe A ₁ s = 55,7 µg/d	<u>Gruppenmittelwert:</u> 50 <u>Max.Wert:</u> (Prob.1,♂, 32 J.): 139 <u>Standardabweichung:</u> für Gruppe B ₁ s = 50 µg/d
t = 1,52	

Beurteilung:

Am 1. Versuchstag ist bei 6 Probanden der Gruppe A₁ und bei 2 Probanden der Gruppe B₁ mit der verwendeten Methode keine Pregnantriolonausscheidung nachzuweisen. Die Mittelwerte beider Gruppen sind (unter Berücksichtigung aller Probanden, n_{A1} = 10, n_{B1} = 8) praktisch identisch. Die Standardabweichung s variiert unter Berücksichtigung aller Probanden (für A₁ n = 10, für B₁ n = 8) für beide Gruppen nur minimal.

Tabelle 7: Mittelwert $\bar{x}$ aus den Doppelbestimmungen von Pregnantriolon am 2. Versuchstag (nach ACTH-Belastung). Gruppenmittelwerte. Standardabweichung s der Gruppen A_2 und B_2 . t-Test.

Gruppe	Prob. Nr.	♂/♀	Pregnantriolon μg/d	Gruppe	Prob. Nr.	♂/♀	Pregnantriolon μg/d
A ₂ (n=10)	1	♂	244	B ₂ (n=8)	1	♂	430
	2	♂	262		3	♂	193
	4	♂	150		5	♂	549
	6	♂	336		7	♂	461
	8	♂	132		2	♀	201
	3	♀	166		4	♀	345
	5	♀	223		6	♀	96
	7	♀	118		8	♀	250
	9	♀	205		-	-	-
	10	♀	145		-	-	-
Pregnantriolon μg/d				Pregnantriolon μg/d			
Gruppenmittelwert: 198				Gruppenmittelwert: 315			
Max.Wert:				Max.Wert:			
(Prob.6,♂, 23 J.): 336				(Prob.5,♂, 35 J.): 549			
Min.Wert:				Min.Wert:			
(Prob.7,♀, 24 J.): 118				(Prob.6,♀, 33 J.): 96			
Standardabweichung:				Standardabweichung:			
für Gruppe A ₂				für Gruppe B ₂			
s = 69 μg/d				s = 156 μg/d			
t = 2,15 ≡ p < 0,05							

Beurteilung:

Den höchsten Pregnantriolonanstieg der Gruppe B zeigte derselbe Proband, der auch den höchsten Pregnantriolanstieg

hatte (s. Tabelle 3). Den niedrigsten Pregnantriolonwert nach Belastung zeigte eine heterozygote Probandin (Nr.B6), die auch die insgesamt niedrigste Pregnantriolonausscheidung am 2. und 3. Tag (s. Tabelle 8) aufwies.

Die Signifikanz-Prüfung ergibt:

$t = 2,15$. Das zugehörige p für zweiseitige Verteilung ist $< 0,05$. D.h., die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Annahme, daß sich die Absolutwerte der beiden Kollektive A und B signifikant unterscheiden, beträgt 5%. Es besteht also unter ACTH-Belastung ein signifikanter Unterschied in der Pregnantriolon-Ausscheidung bei den Kollektiven. Die Standardabweichung (biologische Streuung) der Gruppe B_2 ist mehr als doppelt so groß als in der Gruppe A_2 . Unter Belastungsbedingungen waren bei allen Probanden Pregnantriolonausscheidungen nachzuweisen.

Tabelle 8: Mittelwerte $\bar{x}$ aus den Doppelbestimmungen von Pregnantriolon am 3. Versuchstag (ohne erneute Stimulation der NNR). Gruppenmittelwerte. Standardabweichung s der Gruppen A_3 und B_3 . t-Test.

Gruppe	Prob. Nr.	♂/♀	Pregnantriolon $\mu\text{g/d}$	Gruppe	Prob. Nr.	♂/♀	Pregnantriolon $\mu\text{g/d}$
A_1 (n=5)	1	♂	447	B_1 (n=8)	1	♂	112
	2	♂	329		3	♂	100
	3	♀	302		5	♂	570
	5	♀	442		7	♂	394
	10	♀	253		2	♀	394
	-	-	-		4	♀	439
	-	-	-		6	♀	85
	-	-	-		8	♀	213
<u>Pregnantriolon $\mu\text{g/d}$</u> <u>Gruppenmittelwert:</u> 354 <u>Max.Wert:</u> (Prob.1,♂, 26 J.): 447 <u>Min.Wert:</u> (Prob.10,♀, 23 J.):253 <u>Standardabweichung:</u> für Gruppe A_3 $s = 86,3 \mu\text{g/d}$				<u>Pregnantriolon $\mu\text{g/d}$</u> <u>Gruppenmittelwert:</u> 288 <u>Max.Wert:</u> (Prob.5,♂, 35 J.): 570 <u>Min.Wert:</u> (Prob.6,♀, 33 J.): 85 <u>Standardabweichung:</u> für Gruppe B_3 $s = 184,3 \mu\text{g/d}$			
$t = 0,75$							

Beurteilung:

Der Gruppenmittelwert der Gruppe A_3 (Vergleichspersonen) liegt deutlich über dem der Gruppe B_3 , allerdings rekrutiert er sich aus weniger Probanden. Der Maximalwert der Gruppe B_3 stammt vom selben Probanden, der auch bei der Pregnantriol-Untersuchung an allen Untersuchungstagen die

höchsten Werte zeigte. Der niedrigste Wert überhaupt (85 $\mu\text{g/d}$) liegt wie am 2. Versuchstag in Gruppe B, bei derselben Probandin Nr.6. Eine derartige Übereinstimmung ist in Gruppe A nicht zu beobachten. Die Standardabweichung der Gruppe B₃ ist mehr als doppelt so hoch wie in Gruppe A₃.

Variationskoeffizient für 49 Pregnantriolon-Werte (wobei die Werte unter der Nachweisgrenze mit Null angesetzt wurden):

$$\underline{v = 21,1 \% .}$$

Die methodische Streubreite für die Pregnantriolonbestimmung liegt bei 20%.

Tabelle 9: Anstieg der Pregnantriolon-Ausscheidung ($\mu\text{g/d}$) am 2. und 3.Versuchstag in Bezug auf den Ausgangswert. t-Test.

Gruppe A				Gruppe B			
Prob. Nr.	$\sigma/\varnothing$	Pregnantriolon-anstieg $\mu\text{g/d}$		Prob. Nr.	$\sigma/\varnothing$	Pregnantriolon-anstieg $\mu\text{g/d}$	
		2.Tag	3.Tag			2.Tag	3.Tag
1	σ	126	330	1	σ	291	-27 (!)
2	σ	192	259	3	σ	149	56
4	σ	150	-	5	σ	445	465
6	σ	219	-	7	σ	461	394
8	σ	19	-	2	$\varnothing$	151	345
3	$\varnothing$	165	302	4	$\varnothing$	305	399
5	$\varnothing$	223	441	6	$\varnothing$	75	64
7	$\varnothing$	118	-	8	$\varnothing$	250	214
9	$\varnothing$	205	-	-	-	-	-
10	$\varnothing$	145	253	-	-	-	-

Für 2. Versuchstag: $t = 2,24 \equiv p < 0,05$

Für 3. Versuchstag: $t = 0,87$

Beurteilung:

Es fällt auf, daß die Pregnantriolonanstiege am 3.Tag bei allen untersuchten Probanden der Gruppe A über denen des 2.Tages liegen, dies jedoch nur bei 3 Probanden der Heterozygoten-Gruppe (B) der Fall ist. Bei den übrigen Probanden der Gruppe B zeigt sich ein mehr oder weniger deutlicher Abfall der Pregnantriolonausscheidung gegenüber dem 2.Tag. Auch dies ein Hinweis auf die Notwendigkeit, bei Verwendung von ACTH-Depotpräparaten auch am Tag nach der eigentlichen Belastung die Pregnantriolonausscheidung zu untersuchen.

Die Signifikanz-Prüfung ergibt für den 2. Versuchstag: $t = 2,24$.

Das zugehörige p für zweiseitige Verteilung ist $\leq 0,05$.
D.h., die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Annahme, daß der Anstieg der Pregnantriolonausscheidung am 2. Versuchstag in beiden Kollektiven signifikant unterschiedlich ist, beträgt 5 %.

Es besteht also unter ACTH-Belastung am 2. Versuchstag ein signifikant unterschiedlicher Anstieg der Pregnantriolonausscheidung in beiden Kollektiven.

Am 3. Versuchstag (ohne erneute ACTH-Stimulation) besteht hingegen kein signifikanter Unterschied im Anstieg der Pregnantriolonausscheidung zwischen den Gruppen A und B.

Graphische Darstellung des Pregnantriolon-Anstiegs bei gesunden Vergleichspersonen und AGS-Eltern siehe Abb.2 .

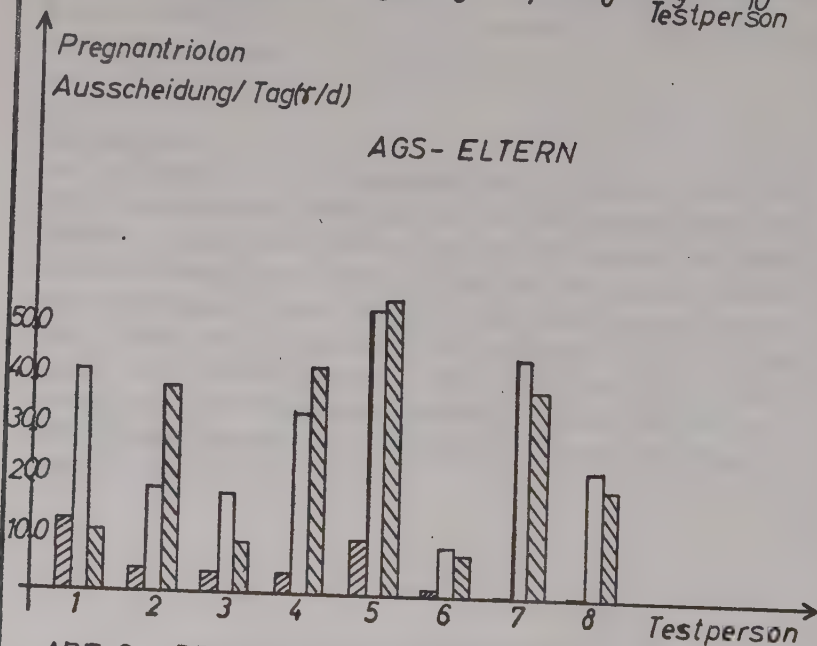
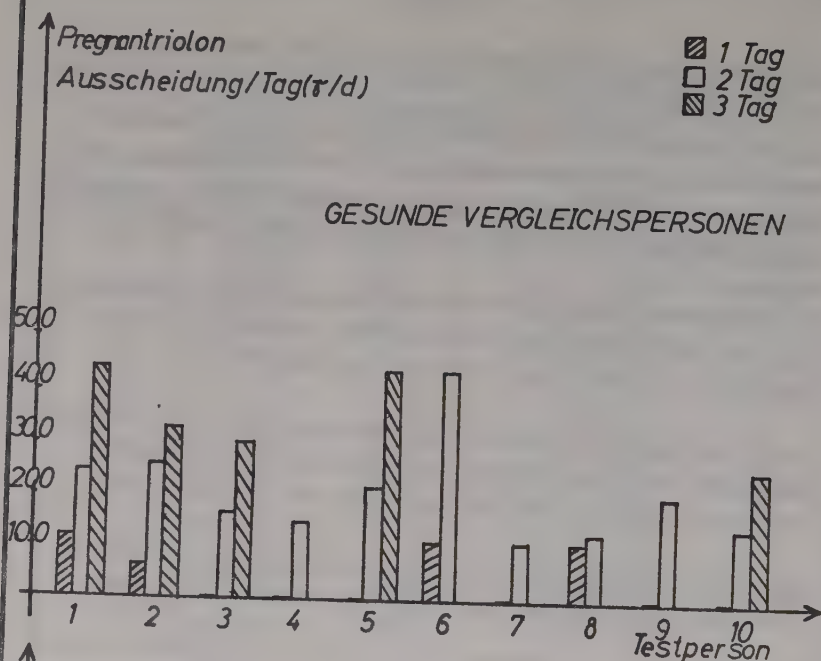


ABB. 2 PREGNANTRIOLONANSTIEG NACH
ACTH-INJEKTION

D.II. Signifikanz-Prüfung (t-Test).

Geprüft wurde die Hypothese, daß heterozygote Merkmalsträger eines kongenitalen AGS und mutmaßlich unbelastete Probanden möglicherweise ein signifikant unterschiedliches Verhalten in der Ausscheidung bestimmter NNR-Metaboliten (Pregnantriol und Pregnantriolon) nach ACTH-Belastung zeigen.

Die Signifikanzprüfung der Absolutwerte erfolgt unter Anwendung der unter D.1.7. angegebenen Formel.

Es wurden in die t-Tabelle für zweiseitige Verteilung eingegangen, die Zahl der Freiheitsgrade ist $(n_1 + n_2) - 2$.

Die Anwendung des t-Tests für so kleine Kollektive wie die unserer Untersuchung ist zulässig, wenn man annehmen darf, daß innerhalb der Kollektive Normalverteilung besteht. Eine Prüfung auf Normalverteilung ist jedoch bei 8-10 Werten kaum möglich, so daß hier die theoretische Überlegung den Ausschlag gibt.

1. Pregnantriol (Zusammenfassung)

1. Versuchstag: $t = 0,0273$ (statistisch nicht different)

2. Versuchstag: $t = 2,6480 \equiv p < 0,02$

3. Versuchstag: $t = 0,8532$ (statistisch nicht different)

Anstieg vom 2. Versuchstag: $t = 4,66 \equiv p < 0,001$

Anstieg vom 3. Versuchstag: $t = 0,40$ (statistisch nicht different)

In der Untersuchung der Pregnantriolausscheidung besteht für den 2. Versuchstag (Tag der ACTH-Belastung) ein signifikanter Unterschied zwischen den Kollektiven A und B (Irrtumswahrscheinlichkeit lediglich 2 %).

An den anderen beiden Versuchstagen besteht kein signifikanter Unterschied in der Pregnantriolausscheidung der beiden Gruppen.

Der Anstieg der Pregnantriolausscheidung (in $\mu\text{g}/\text{d}$) in Bezug auf den Ausgangswert ist in den beiden Kollektiven am 2. Versuchstag (Tag der ACTH-Belastung) signifikant different (Irrtumswahrscheinlichkeit 0,1%).

Am 3. Tag, ohne erneute ACTH-Belastung, bestent dagegen kein signifikant unterschiedlicher Anstieg der Pregnantriolausscheidung zwischen beiden Gruppen.

2. Pregnantriolon (Zusammenfassung)

1. Versuchstag: $t = 1,5200$ (statistisch nicht different)

2. Versuchstag: $t = 2,1488 \equiv p < 0,05$

3. Versuchstag: $t = 0,7464$ (statistisch nicht different)

Anstieg am 2. Versuchstag: $t = 2,24 \equiv P < 0,05$

Anstieg am 3. Versuchstag: $t = 0,87$ (statistisch nicht different)

In der Untersuchung der Pregnantriolausscheidung besteht für den 2. Versuchstag (Tag der ACTH-Belastung) ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kollektiven A und B (Irrtumswahrscheinlichkeit 5%). An den beiden anderen Tagen zeigt sich kein signifikant unterschiedliches Verhalten beider Gruppen.

Der Anstieg der Pregnantriolonausscheidung (in $\mu\text{g}/\text{d}$) in Bezug auf den Ausgangswert ist in beiden Gruppen am 2. Versuchstag signifikant different (Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %). Am 3. Versuchstag (ohne erneute ACTH-Belastung) besteht dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe A und B.

Beurteilung:

Die Ergebnisse des t-Tests zeigen ein signifikant unterschiedliches Verhalten heterozygoter Merkmalsträger und genetisch

unbelasteter Probanden unter ACTH-Belastung. Eine Nachprüfung dieser Ergebnisse an größeren, eventuell nach mehreren Parametern aufgeschlüsselten Kollektiven ist erforderlich, ebenso die Prüfung der Normalverteilung innerhalb größerer Kollektive.

Eine konsequente Untersuchung zahlreicher Probanden am Tag nach der eigentlichen NNR-Stimulation (bei Verwendung von ACTH-Depotpräparaten) ist im Hinblick auf ein möglicherweise ebenfalls signifikant unterschiedliches Verhalten zwischen Heterozygoten und gesunden Probanden zu überlegen.

E. Diskussion.

Die in der vorliegenden Untersuchung zu Tage getretene große Streubreite der individuellen Pregnantriolausscheidung der Probanden wird durch andere Untersuchungen bestätigt. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß die bisher vorliegenden 'Normalwerte' mit verschiedenen Untersuchungsmethoden gewonnen wurden.

Nach der erstmaligen Isolierung und Identifizierung des Pregnantriols durch BUTLER und MARRIAN 1937 (11), wurden für die Analyse dieser Metaboliten bis etwa 1960 spektrophotometrische Methoden eingesetzt (GLEISPACH (22)). Seither hat sich allgemein die gaschromatische Analyse hierfür durchgesetzt, da diese Methode für die Bestimmung von Steroideinzelmetaboliten wesentlich genauer ist (RIVERA et al.(53)), mit Ausnahme der Doppelisotopentechnik die genaueste (GLEISPACH (22)).

Normalwerte der Pregnantriol-Tagesausscheidung bei klinisch gesunden Erwachsenen:

BONGIOVANNI und CLAYTON (8), 1954: 0,2 - 1,8 mg/d (spektrometrisch).

FAREDIN und TOTH (17), 1964 (spektrometrisch) in den für den Vergleich mit unseren Probanden interessanten Altersgruppen:

♂ (20 - 47 J.): 0,73 - 1,81 mg/d (wobei die meisten Werte über 1 mg/d liegen, ein Absinken der Werte nach dem 30. Lebensjahr ist erkennbar).

♀ (23 - 45 J.): 0,52 - 2,08 mg/d (wobei bei den Probanden über 38 J. alle Werte unter 1 mg/d).

Gaschromatographische Untersuchungen:

- RIVERA et al.(53), 1967: ♂: 0,17 - 1,67 mg/d
♀: 0,28 - 1,83 mg/d (im letzten
Trimenon der Gravidität
1,62 - 2,64 mg/d).
- ZAMORA et al.(63), 1969: ♂ (25 - 33 J.): 1,50 - 1,90 mg/d
♀ (17 - 21 J.): 0,176 - 1,6 mg/d
- QUAZI et al.(48), 1971: ♂ (Durchschnittswerte): 0,77 mg/d
♀ (" "): 0,63 mg/d
- PRADER und ZACHMANN (43), 1971: bis 3 mg/d.

Angesichts dieser Streubreite fällt von unseren Probanden am 1.Versuchstag (ohne ACTH-Belastung) lediglich ein heterozygot belasteter (Gruppe B, Prob.5, ♂, 35 J.) mit einer Ausscheidung von 4,72 mg/d deutlich aus dem Rahmen. Da dieser Proband auch an den folgenden Versuchstagen jeweils die mit Abstand höchsten Pregnantriolausscheidungen aller Probanden zeigte, handelt es sich hier möglicherweise um eine sehr milde Ausprägung eines homozygoten Status ohne wesentliche klinische Symptome.

Bei isolierter Betrachtung der ♀ Probanden unserer Untersuchung zeigen 3 ♀ auffallend niedrige Ausgangswerte (0,086 bzw. 0,135 mg/d), andere wesentlich höhere (bis zu 2,678 mg/d). Diese Unterschiede sind möglicherweise zyklusbedingt: PICKETT et al.(41) wiesen eine erhöhte Pregnantriolausscheidung nach der Ovulation bis kurz vor Zyklusende nach, wobei ein Teil des zu Pregnantriol metabolisierten 17α -Hydroxyprogesteron möglicherweise aus den Ovarien stammt. Übereinstimmend mit PICKETT et al. fanden ZAMORA et al.(63) die höchste Pregnantriolausscheidung in der 2. Zyklushälfte, mit einem beträchtlichen Abfall unmittelbar vor Beginn des nächsten Zyklus.

Bei Untersuchungen größerer Kollektive als dem unseren sollten diese Ergebnisse berücksichtigt werden, und alle Urinsammlungen möglichst in der 1. oder 2. Zyklushälfte durchgeführt werden.

Den ersten großangelegten Versuch der Erkennung heterozygoter Merkmalsträger durch Stimulation der NNR mit ACTH (60 - 80 I.E.) unternahm 1956 CHILDS et al.(12) an 20 AGS-Elternteilen und 18 Kontrollpersonen. Die Steigerung der Pregnantriolausscheidung war bei den Heterozygoten im Durchschnitt 2 - 5% höher. Der Unterschied der Mittelwerte der Pregnantriolausscheidung war mit $p = 0,02 - 0,05$ signifikant, wenn auch nicht hochsignifikant. In der Häufigkeitsverteilung der Einzelwerte fanden sich allerdings eine deutliche Überlappung beider Kollektive im unteren und mittleren Bereich. In der Ausscheidung der 17-Ketosteroide und von Pregnan diol waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Die Autoren betonen, daß nur zufällig einmal durch einen derartigen Belastungstest ein Heterozygoter aus der Allgemeinbevölkerung herausgefunden werden kann.

1962 unterzogen CLEVELAND et al.(13) 5 AGS-Elternpaare und 6 Kontrollpersonen einem Metopiron-Test mit SU 4885 (Metopiron). Die Hemmung der C-11-Hydroxylase löst eine endogene ACTH-Stimulation aus, wodurch sich bei einem bereits bestehenden Enzymdefekt die AGS-Symptomatik verstärkt. Die Ergebnisse sind aber für einen Heterozygotentest nicht verwendbar, da die Untersucher bei den Eltern (bis auf eine Ausnahme) keine pathologische Ausscheidung fanden. Nur ein Vater zeigte eine erhöhte Pregnantriolausscheidung, wobei die Autoren in ihm einen bisher unerkannten Homozygoten mit minimaler klinischer Symptomatik vermuten.

1971 untersuchten QUAZI et al.(48) unter anderem die Pregnantriolausscheidung von 43 AGS-Elternteilen und 39 erwachsenen Kontrollpersonen ohne Stimulation der NNR. Der Vergleich beider Kollektive ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Müttern und den ♀ Kontrollpersonen. Die Ursache dafür sehen die Autoren in der größeren Tagesschwankung der Steroidausscheidung im Urin bei Frauen. (Ihre 24-Std.-Urinsammlungen wurden zwischen dem 5. und 28. Zyklustag durchgeführt). Die Väter schieden insgesamt als Gruppe verschiedene Steroide vermehrt aus (signifikant höhere Ausscheidung von 11-Hydroxyandrosteron und 11-Oxy-17-Ketosteroiden), nicht jedoch Pregnantriol.

Die Untersuchung unserer gemischt-geschlechtlichen Kollektive ergab unter ACTH-Stimulation (2.Versuchstag) einen signifikanten Unterschied in der Pregnantriolausscheidung und im Anstieg der Ausscheidung bezogen auf den Ausgangswert ohne ACTH-Stimulation. Ob dieses Ergebnis der Prüfung eines zahlenmäßig größeren, nach mehreren Parametern aufgeschlüsselten Kollektivs standhält, oder ob es sich angesichts der niedrigen Probandenzahl doch um ein Zufallsbefund handelt, bleibt abzuwarten. Die große Variabilität der Ausgangswerte könnte durch zukünftige Steroidbestimmungen an mehreren Tagen, und damit der Ermittlung der individuellen 'Durchschnittsekretion', sowie durch gleiche äußere Bedingungen der Probanden (etwa Bettruhe oder striktes Verbot sportlicher Betätigung) womöglich eingengt werden.

Das Auftreten von Pregnantriolon im 24-Std.-Urin gilt als wesentlich feinerer Indikator als Pregnantriol für einen C-21-Hydroxylase-Defekt, bei dem es regelmäßig nachgewiesen werden kann (FINKELSTEIN (19)).

Abgesehen von der virilisierenden NNR-Hyperplasie wurde es bisher beim Cushing-Syndrom (19), beim Stein-Leventhal-Syndrom (19) und in einigen Fällen eines postnatal 'erworbenen' AGS (postnatale Virilisierung) nachgewiesen (19). Zum Begriff 'erworbenes' AGS siehe auch Kapitel A.

Bei klinisch gesunden Erwachsenen konnte FINKELSTEIN (19) mit der von ihm verwendeten Papierchromatographie kein Pregnantriolon nachweisen, auch nicht nach ACTH-Stimulierung. (Obwohl die Nachweisgrenze einzelner Untersuchungen bei $2 \mu\text{g/d}$ lag). FINKELSTEIN vermutet, daß die Normalausscheidung von Pregnantriolon unter $1 \mu\text{g/d}$ liegt. ZAMORA et al.(63) konnten (gaschromatographisch) bei 9 erwachsenen Probanden zwischen 17 und 33 Jahren ebenfalls kein Pregnantriolon nachweisen. GLEISPACH et al.(23) fanden bei ca. 50 gesunden Probanden mit 2 Ausnahmen weder im Leeharn noch nach ACTH-Stimulation eine Pregnantriononausscheidung.

In einer Untersuchung der Pregnantriononausscheidung vor und nach ACTH-Stimulierung bei mutmaßlich heterozygoten Merkmalsträgern (den Eltern und Geschwistern von 4 bekannten AGS-Patienten einer Familie) konnten GLEISPACH et al.(23) beim Vater bereits im Leeharn Pregnantriolon in geringer Menge nachweisen ($60 \mu\text{g/d}$), nach Stimulation bei allen Heterozygoten (Vater: $210 \mu\text{g/d}$, Mutter: $234 \mu\text{g/d}$).

In unserer Untersuchung ist Pregnantriolon am Tag der ACTH-Belastung in beiden Kollektiven signifikant different. Am 1. und 3. Versuchstag besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kollektiven. Ebenso ist der Anstieg der Pregnantriononausscheidung bezogen auf den Ausgangswert (ohne ACTH-Stimulation) signifikant different. Bei der Mehrzahl der Probanden der Kontrollgruppe A ließ sich -

- in Übereinstimmung mit den zitierten Ergebnissen anderer Autoren - ohne ACTH-Belastung kein Pregnantriolon nachweisen. Bei den heterozygoten Merkmalsträgern zeigten 3/4 aller Probanden eine, wenn auch teilweise sehr geringe Pregnantriononausscheidung am 1. Versuchstag. Bei den 4 Probanden der Kontrollgruppe A, bei denen am 1. Versuchstag eine meßbare Pregnantriononausscheidung bestand, handelt es sich ausschließlich um ♂ Probanden. Möglicherweise ist ein heterozygoter Merkmalsträger ohne faßbare klinische Symptomatik darunter. Bei zwei der Probanden könnte auch - unter Korrelierung mit ihren relativ hohen Pregnantriol-Ausscheidungswerten - eine 'endogene' Stimulation, d.h., eine Streßsituation am 1. Versuchstag bestanden haben.

Bei Werten am Rande der Nachweisgrenze nehmen Schwankungen der Einzelbestimmungen und Fehlerbreite naturgemäß zu. Die Ergebnisse des 1. Versuchstages sind deshalb mit Zurückhaltung zu interpretieren. Die bei allen unseren Probanden nach ACTH-Belastung nachweisbare Pregnantriononausscheidung bedarf der Überprüfung in einem größeren Kollektiv.

F. Zusammenfassung.

Auf der Suche nach einem aussagekräftigen Heterozygoten-Test wurde ein ACTH-Belastungstest an 8 heterozygoten Merkmalsträgern eines kongenitalen AGS und 10 mutmaßlich genetisch unbelasteten Vergleichspersonen durchgeführt.

Dabei wurden die Tagesausscheidungen von Pregnantriol und Pregnantriolon im Urin unter Normalbedingungen und nach exogener Stimulation der NNR untersucht. Die Versuchsdurchführung, Analysemethode und statistische Auswertung der Meßergebnisse sind dargestellt worden.

Der Vergleich der beiden Kollektive unter ACTH-Belastung ergibt einen signifikanten Unterschied im Verhalten der beiden Gruppen. Die Streubreite der einzelnen Werte an den verschiedenen Versuchstagen ist beträchtlich, ebenso besteht eine deutliche Überlappung vieler Werte aus beiden Kollektiven. Die Ergebnisse zeigen auch die Notwendigkeit der generellen Untersuchung aller Probanden am Tag nach der eigentlichen ACTH-Belastung bei Verwendung von ACTH-Depot-Präparaten.

Die große Variabilität der Ausgangswerte könnte durch zukünftige Steroidbestimmung an mehreren Tagen und damit der individuellen 'Durchschnittssekretion' der einzelnen Probanden, sowie durch gleiche äußere Bedingungen aller Probanden (etwa Bettruhe) eingeengt werden.

Ein weiterer Vorteil zukünftiger Untersuchungen dürfte in der Bestimmung des bei einem C-21-Hydroxylasedefekt unmittelbar betroffenen und angestauten 17 α -Hydroxyprogesterons liegen, das möglicherweise ein wesentlich feinerer Indikator für eine latente C-21-Hydroxylase-Schwäche ist.

Alle bisherigen Ergebnisse auf der Suche nach einem aussagekräftigen Heterozygotentest machen weitere detaillierte Untersuchungen erforderlich.

G. Literaturverzeichnis

- 1 BIERICH, J.: Adrenogenitales Syndrom. In: Die Intersexualität (Hrsg. C. Overzier). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1961, S. 353 ff.
- 2 BIERICH, J.: Die Dauertherapie des kongenitalen adrenogenitalen Syndroms. Vortrag Nordwestdeutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde, Hamburg, April 1970.
- 3 BLIZZARD, R.M., WILKINS, L.: Present Concepts of Steroid Therapy in Virilizing Adrenal Hyperplasia. In: Arch. Intern. Med., 100, 1957, S. 729-738.
- 4 BLUNCK, W.: Die Diagnostik des angeborenen adrenogenitalen Syndroms. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 94. Jahrgang, Nr. 15, Stuttgart, 11. April 1969, S. 789-791.
- 5 BONGIOVANNI, A.M.: Defects in the Biosynthesis of Cortisol in the Human Adrenal Gland. In: Proceedings of the Second International Congress on Hormonal Steroids, Milan, May 1966. Ed.: L. Martini, F. Fraschini, M. Motta. Excerpta Medica Foundation, International Congress Series, No. 132, Amsterdam, N.Y., London, S. 96 ff.
- 6 BONGIOVANNI, A.M., EBERLEIN, W.: Defective Steroidal Biogenesis in Congenital Adrenal Hyperplasia. E. Mead Johnson Award Addresses, in: Pediatrics, Vol. 21, 1958, Number 4, S. 661 ff.
- 7 BONGIOVANNI, A.M., EBERLEIN, W., GOLDMAN, A., NEW, M.: Disorders of Adrenal Steroid Biogenesis. In: Recent Progress in Hormone Research Proceedings of the 1966 Laurentian Hormone Conference. Ed. by George Pincus, Vol. 23. Academic Press, N.Y., London, 1967, S. 375 ff.
- 8 BONGIOVANNI, A.M., CLAYTON JR., C.W.: A simplified method for the routine determination of Pregnanediol and Pregnanetriol in Urine. Bull. J. Hopkins Hosp., 94, 1954, S. 180-186.

- 9 BONGIOVANNI,A.M., EBERLEIN,W., MOSHANG JR.,Th.:
Urinary Excretion of Pregnanetriol and Δ^5 -Pregnene-
triol in Two Forms of Congenital Adrenal Hyperplasia.
In: The Journal of Clinical Investigation, Vol.50,
No.12, 1971, S.2751 ff.
- 10 BUTENANDT,O.:Gestörtes Wachstum beim behandelten
Kongenitalen Adrenogenitalen Syndrom. Zeitschrift
für Kinderheilkunde, 97, 1966, S.202-217.
- 11 BUTLER,G.C., MARRIAN,G.F.: Isolation of pregnane-
3,17,20-triol from Urine of Women showing Adreno-
genitale Syndrome. J.biol.Chem., 119, 1937, S.565.
- 12 CHILDS,B., GRUMBACH,M.M., VAN WYK, J.J.: Virilizing
adrenal hyperplasia. A genetic and hormonal study.
Journal of Clinical Investigation, 35, 1956, S.213.
- 13 CLEVELAND,W.W., NIKEZIC,M., MIGEON,C.J.: Response to
an 11-Hydroxylase inhibitor (SU 4885) in males with
adrenal hyperplasia and their parents. J.of clinical
Endocrinology, 22, 1962, S.281 ff.
- 14 CURTIUS,H.-Ch., MÜLLER,M.: Gas-Liquid Chromatography
of 17-Ketosteroids and Progesterone metabolites of
urine: Comparison of different methods of Hydrolysis.
Journal of Chromatography, 30, 1967, S.410-427.
- 15 DEGENHARDT,H.J., VISSER,H.V.A., WILMINK, R., CROUGHS,W.:
Aldosterone and cortisol secretion rates in infants
with congenital adrenal hyperplasia. Acta endocrino-
logica, 48, 1965, S.587.
- 16 EBERLEIN,W.: Fetal Adrenal Funktion in Congenital
Hyperplasia. In: Proceedings of the Second International
Congress on Hormone Steroids, Milan, May 1966.
Ed.: L.Martini, F.Fraschini, M.Motta. Excerpta Medica
Foundation. International Congress Series No.132.
Amsterdam, New York, London.
- 17 FAREDIN,J., TOTH,J.: Steroid Studies on Florisil Adsor-
bent Column. IV.Pregnanetriol Determination in Human
Urine. In: Acta Medica. Academiae Scientiarum Hunga-
ricae, Tomus XX, Fasciculus 2, 1964, S.193 ff.

- 18 FIEGEL,G., KELLING,H.W.: Adrenogenitales Syndrom.
In: Die Anwendung von Kortikoiden und anabolen Substanzen in Klinik und Praxis. F.Enke Verlag, Stuttgart, 1962, S.176-177.
- 19 FINKELSTEIN,M.: Pregnanetriolone, an abnormal urinary steroid. In: Methods in hormone research (Ed.: R.J. Dorfmann), Academic Press, N.Y., London, 1962, S.169 ff
- 20 GARDNER,Lytt J.: Adrenal Function in the Premature and Newborn. Pediatrics, 17, 1956.
- 21 GARDNER,Lytt J.: Disorders of the Adrenal Cortex. Development of the Normal Fetal and Neonatal Adrenal. In: Endocrine and genetic disorders of childhood. (by Lytt J. Gardner). W.B.Saunders Company, Philadelphia, London, 1969, S.392 ff.
- 22 GLEISPACH,H.: Gaschromatographische Bestimmung von Steroidhormonen aus dem Harn. Schriftenreihe der Angewendeten Gaschromatographie, Heft 12, Bodensee-Werke Perkin Elmar & Co GmbH, 1969.
- 23 GLEISPACH,H., BERGER,H., GLATZL,J., RÖSSLER,H., TSCHAGER,E.: Pregnantriolon - Ausscheidung nach ACTH-Stimulierung bei mutmaßlich heterozygoten Merkmalsträgern eines 21-Hydroxylasendefektes. Pädiatrie und Pädologie, 6, Springer Verlag, 1971, S.287-296.
- 24 GRUMBACH,M.M., WILKINS,L.: The Pathogenesis and Treatment of Virilizing Adrenal Hyperplasia. Pediatrics, 17, 1956, S.418-427.
- 25 HALPERIN,G., FINKELSTEIN,M.: Biosynthesis of Pregnanetriolone and Pregnanetetrol in Congenital Adrenal Hyperplasia. Acta Endocrinologica, 54, 1967, S.439-451.
- 26 HAMILTON,W.: The nature of the enzyme defect in salt-losing and non salt-losing forms of C²¹-hydroxylase deficiency. Acta Paediat.Scand., 61, 1972, S.250 f.

- 27 HELWIG, H.: Die Behandlung des adrenogenitalen Syndroms im Kindesalter. Monatsschrift für Kinderheilkunde, Band 114, Heft 4, 1966, S.261-265.
- 28 HUBLE, D.: Retardation of Skeletal Maturation and Linear Growth in the Treatment of the Simple Virilizing Form of Congenital Adrenal Hyperplasia. Aust.Paediatric Journal, Vol.1, June 1965, S.84 ff.
- 29 KAISER, H.: Das adrenogenitale Syndrom. In: Cortison-derivate in Klinik und Praxis. Thieme Verlag, Stuttgart 1965, S.14 ff.
- 30 KAUEWITZ, F.: Ein-Gen-Ein-Enzym-Hypothese. In: Erbliche Stoffwechselkrankheiten (Hrsg.F.Linneweh), Urban & Schwarzenberg Verlag, 1962, S.21 ff.
- 31 KNORR, D.: Heterosexuelle und isosexuelle Reifungsstörung, Teil I: Chirurgische Praxis, 11, E.und H. Marseille Verlag, München, 1967, S.145-154.
- 32 KNORR, D.: Heterosexuelle und isosexuelle Reifungsstörungen, Teil II: Pädiatr. Praxis, 5, E.und H. Marseille Verlag, München, 1966, S.177-187.
- 33 KNORR, D.: Untersuchung zur Altersabhängigkeit der Ausscheidung einzelner chromatographisch getrennter Steroide während des Kindes- und Reifungsalters. In: Fortschritte des Pädologie, Bd.I, Hrsg. F.Linneweh, Springer Verlag, Berlin, 1965
- 34 LENZ, W.: Zur Genetik der Stoffwechselstörungen. Hauptthema Angeborene Stoffwechselstörungen. In: Verhandlungen der Dt.Gesellschaft für Verdauungs und Stoffwechselkrankheiten, 21.Tagung, Hamburg, Sept. 1961. Gastroenterologia, 97, 1962, S.226-233.
- 35 LINNEWEH, F.: Fortschritte in der Diagnostik heterozygoter Merkmalsträger in erblichen Stoffwechselkrankheiten. In: Monatsschrift für Kinderheilkunde, Bd.122, 1964, S.169 ff.

- 36 NEUMANN, F., STEINBECK, H.: Antiandrogene. Tierexperimentelle Grundlagen und klinische Anwendungsmöglichkeiten. *Internist*, 12, 5, 1971, S.198-205.
- 37 NITOWSKY, H., LEGUM, C.P.: Techniques and methods for identifying fetal genetic disease. Heterozygote Detection In: *Advances in Pediatrics*, Vol.18, 1971, S.54-66.
- 38 NORMAN, A.P.: Intersex States. In: *Congenital Abnormalities in Infancy*. (Edited by A.P.Norman). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1963, S.200 ff.
- 39 OVERZIER, C.: Intersex - Eine Übersicht. *Pädiatr. Fortbildungskurse*, Vol.25, S.Karger Verlag, Basel, New York, 1969, S.67-75.
- 40 PALITZSCH, D.: Das adrenogenitale Syndrom. In: *Cortisonfibel für die Kinderärztliche Praxis*. J.F.Lehmanns Verlag, München, 1964, S.39 ff.
- 41 PICKETT, M.T., KELLIE, A.E., SOMERVILLE, J.F.: Urinary excretion of pregnanetriol in the menstrual cycle. I und II. *Acta endocrinologica (Kbh.)*, 41, 1962, S.129 ff.
- 42 PRADER, A.: Adrenogenitales Syndrom, adrenogenitales Salzverlustsyndrom und Cushing-Syndrom im Kindesalter. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, 86.Jahrgang, Nr.12, 24.März 1956, S.289 ff.
- 43 PRADER, A., ZACHMANN, M.: Das adrenogenitale Syndrom. In: *Klinik der Inneren Sekretion*. Hrsg. A.Labhardt. Springer Verlag, Berlin, 1971, S.366 ff.
- 44 PRADER, A., ANDERS, G.J., HABICH, H.: Zur Genetik des Kongenitalen adrenogenitalen Syndroms (virilisierende Nebennierenhyperplasie). *Helvetica Paediatrica Acta*, Vol.17, Fasc. 4/5, 1962, S.271 ff.
- 45 PRADER, A.: Die Häufigkeit des kongenitalen adrenogenitalen Syndroms. *Helvetica Paediatrica Acta*, Bd.13, 1958, S.426 ff.

- 46 PRADER,A.: Synthesestörung der Nebennierensteroiden.
In: Erbliche Stoffwechselerkrankungen. Hrsg. F.Linneweh. Urban & Schwarzenberg Verlag, München, 1962.
- 47 PRADER,A.: Vollkommen männliche äußere Genitalentwicklung und Salzverlustsyndrom bei Mädchen mit kongenitalem adrenogenitalem Syndrom. *Helvetica paediatrica acta*, Bd.13, 1958, S.5 ff.
- 48 QUAZI,Q., HILL,J.,THOMPSON,M.: Steroid Studies in Parents of Patients with Congenital Virilizing Adrenal Hyperplasia. *Journal of Clinical Endocrinology*, Vol.33, 1971, S.23 ff.
- 49 RAITI,S., NEWNS,G.H.: Linear Growth in Treated Congenital Adrenal Hyperplasia. *Archives of Diseases of Childhood*, Vol.46, No.247, June 1971, S.376 ff.
- 50 RAPPAPORT,R., LIMAL,J.M.: Evaluation of gonadal and adrenal activity at the initial stage of puberty. *Acta Paediat. Scand.*, 61, 1972, S.245-247.
- 51 RIMOIN,D., SCHIMKE,R.N.: Congenital adrenal hyperplasia. In: *Genetic disorders of the endocrine glands*. The C.V.Mosby Company, St.Louis, 1971, S.225 ff.
- 52 RIMOIN,D., SCHIMKE,R.N.: Modes of Inheritance. Kapitel: Genetic aspects of Clinical Endocrinology. In: *Genetic disorders of the endocrine glands*. The C.V.Mosby Company, St.Louis, 1971, S.7 ff.
- 53 RIVERA,R., DORFMAN,R., FORCHIELLI,E.: A Modified Method for the Analysis of Urinary 17-Ketosteroids, Pregnanediol and Pregnanetriol by Gas Liquid Chromatography in Normal Subjects and Subjects with Various Endocrine Disorders. *Acta Endocrinologica*, 54, 1967, S.37-50.
- 54 SIEGENTHALER,W., SCHÖNBECK,M., WERNING,C.: Nebennierenrinde. Physiologische Grundlagen. Allg. und spez. Pathophysiologie. In: *Klinische Pathophysiologie*. Hrsg. W.Siegenthaler. G.Thieme Verlag, Stuttgart, 1970, S.306 ff.

- 55 SPERLING,M., KENNY,F.M., SCHUTT-AINE,J.C., DRASH,A.L.:
Linear Growth and Growth Hormonal Responsiveness in
Treated Congenital Adrenal Hyperplasia. American
J.Dis.Child., Vol.122, November 1971, S.408 ff.
- 56 UFER,J.: Amenorrhoe bei adrenogenitalem Syndrom.
In: Hormontherapie in der Frauenheilkunde. Walter
de Gruyter Verlag, Berlin, N.Y., 1972, S.98 ff.
- 57 VISSER,H.V.A.: Kongenitale Störungen der Nebennieren-
funktion. In: Endocrinologische Probleme des Kindes-
alters. Sonderheft "Triangel", Sandoz-Zeitschrift
für Medizinische Wissenschaft, Bd.7, Nr.6, 1966,
S.220 ff.
- 58 VOIGT,K.D., ORIOL-BOSCH,A., TAMM,J.: Untersuchungen
über den Einfluß einer intravenösen ACTH-Infusion
auf die Plasma- und Urinsteroide von behandelten
und unbehandelten Patienten mit Cushing-Syndrom.
Klinische Wochenschrift, 38.Jahrgang, 1960, S.260 ff.
- 59 WILKINS,L.:Types of Hyperadrenocorticism - The
Adrenogenital Syndrome. In: Diagnosis and Treatment
of Endocrine Disorders in Childhood and Adolescence.
Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1965,
S.330 ff.
- 60 WILKINS,L., LEWIS,R.A., KLEIN,R., ROSEMBERG,E.:
The Suppression of Androgen Secretion by Cortison
in a Case of Congenital Adrenal Hyperplasia. Prelimi-
nary Report, Bull. John Hopkins Hosp., 86, 1950, S.249.
- 61 WILKINS,L., LEWIS,R.A., KLEIN,R., GARDNER,L.J.JR.,
ROSEMBERG,E., CRIGLER,J.F.JR., MIGEON,C.J.: Treat-
ment of Congenital Adrenal Hyperplasiy with Cortisone.
Journal of Clinical Endocrinology, 11, 1, 1951.
- 62 WISKOTT,A., KNORR,D.: Die Dysfunktion der Nebennieren-
rinde. In: Keller/Wiskott: Lehrbuch der Kinderheil-
kunde. G.Thieme Verlag, Stuttgart, 1969, S.202 ff.

- 63 ZAMORA,E., PLATTNER,D., CURTIUS,H.-CH.: Determination of Urinary Pregnanediol, Pregnanetriol and Pregnanetriolone in Normal Children and Adults by Gas Chromatography. Acta Endocrinologica, 62, 1969, S.315-318.
- 64 ZURBRÜGG,R.P.: Das kongenitale adrenogenitale Syndrom. Pädiatr. Fortbildungskurse, Vol.25, S.Karger Verlag, Basel, New York, 1969, S.76-101.

Für die Gewährung der Arbeitsmöglichkeit danke ich Herrn Prof. Dr. med. K. Betke , Direktor der Universitäts - Kinderklinik München.

Herrn Prof. Dr. med. D. Knorr, Vorstand der Endokrinologischen Abteilung der Universitäts-Kinderklinik gilt mein Dank für die Vergabe des Themas, die Betreuung im Verlauf der Arbeit, alle Ratschläge und Hilfe, insbesondere aber für die sorgfältige Korrektur.

Frl. Wohlfarth danke ich für die Einarbeitung in die Methode der Pregnantriol- und Pregnantriolonbestimmung.

Lebenslauf

Geboren am 4.6.1947 in München als Tochter von Prof. Dr. med. Richard Fikentscher und Dr. med. Margarete Fikentscher, geb. Klischan.

Schulbesuch von 1953 - 1966; Reifezeugnis des Städtischen Theodolinden - Realgymnasiums, München, vom 19.7.1966.

Studium der Medizin an der Universität München vom WS 1966/67 bis einschließlich WS 1971/72.

Naturwissenschaftliche Vorprüfung: Oktober 1967

Ärztliche Vorprüfung : März 1969

Die ärztliche Prüfung wurde nach dem Wintersemester 1971/72 abgelegt (Zeugnis vom 26.7.1972).

Nach Ableistung der einjährigen Medizinalassistentenzeit an der Universitäts Frauenklinik, München, (Gynäkologie), und am Krankenhaus Tutzing/Obb. (Chirurgie und Innere Medizin) Approbation als Ärztin (Urkunde vom 14.1.1974).

Anfertigung der Dissertation an der Kinderklinik der Universität München.

